WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07D 277/04, A61K 31/425, C07D 295/18, 417/12

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/61431

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

2. Dezember 1999 (02.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/03712

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

28. Mai 1999 (28.05.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 23 831.2

28. Mai 1998 (28.05.98)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRO-BIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMIT-TELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, D-06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). GLUND, Konrad [DE/DE]; Aralienstrasse 10, D-06122 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Hegelstrasse 12, D-06114 Halle (DE). KRUBER, Susanne [DE/DE]; Reilstrasse 9, D-06114 Halle (DE).
- (74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar, G. usw.; Boeters & Bauer. Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

- (54) Title: NEW DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV EFFECTORS
- (54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

(57) Abstract

The invention relates to dipeptide compounds or compounds analogous to dipeptide compounds, which are made of an amino acid and a thiazolidine or pyrrolidine group, and to their salts. The invention further relates to the use of these compounds in the treatment of impaired glucose tolerance, glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidoses, diabetes mellitus, diabetic neuropathy and nephropathy as well as secondary diseases of diabetes mellitus in mammals.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosaure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidamie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien				••
AM	Amenien	es Fi	Spansen Finnland	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AT	Osterreich	FR		LT	Litanen	SK	Slowakei
AU	Australien		Frankreich	LU	Luxemburg	8N	Senegal
AZ	Aschaidechan	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
BA		GB	Vereinigtes Königreich	MC	Mounco	TD	Tachad .
BB	Bosnien-Herzegowina	GR	Georgien	MD	Republik Moldan	TG	Togo
	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadachikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MIN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda.
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten vo
CA	Kanada	m	Italien	MX	Mexiko	-	Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Ushekistan
CG	Kongo	KB	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO ·	Norwegen	YU	Jugoslawien
Œ	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	Z₩	Zimbabwe
CM	Kamerua		Korea	PL	Polen	411	Zumbabwe
CN	China	KR	Republik Korea	PT			
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Portugal Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	ic	St. Lucia				
DE	Deutschland	ü	Liechtenstein	RU	Russische Föderation		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
EE	Estland			SE	Schweden		
-443	The state of the s	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 99/61431 PCT/EP99/03712

NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, im weiteren Dipeptidverbindungen genannt, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Die Erfindung betrifft also auch ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration von Säugern mit Hilfe von Dipeptidverbindungen als aktivitätsmindernde Effektoren (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Seguenz darstellen.

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-2 (GIP₁₋₄₁) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆), also Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch Incretine genannt), sind Substrate der DP IV, da diese von den

N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin in vitro und in vivo abspalten kann.

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate in vivo kann dazu dienen,
unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen wie auch
bei pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu
unterdrücken. Z.B. basiert Diabetes mellitus Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw.
Störungen in der Rezeptorfunktion, die u.a. in proteolytisch
bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet
sind.

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch Diabetes mellitus) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, wie auch modernere Verfahren, zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche i.v. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen.

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pan-

kreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems.

Die Verwendung von Alanyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid als Inhibitoren von DP IV bzw. von zu DP IV analoger Enzymaktivität ist bereits aus der PCT/DE 97/00820 und die Verwendung von Isoleucyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid-Hydrochlorid bereits aus der DD 296 075 bekannt. Bei dem in diesem Stand der Technik eingesetzten Isoleucyl-Thiazolidid handelt es sich um natürliches, also L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid: Zum Prioritätsdatum und noch am Anmeldetag der beiden Druckschriften stand nur diese, die natürliche Form von Isoleucyl-Thiazolidid zur Verfügung.

Es ist festgestellt worden, daß diese Verbindungen, insbesondere L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, gute Effektoren für DP IV und DP IV analoge Enzymaktivitäten sind. Bei der Verwendung dieser Verbindung können bei einigen Patienten bzw. Krankheitsformen jedoch gewisse Probleme auftreten:

Je nach Symptomen und Schwere z.B. von Diabetes mellitus, wäre es z.B. wünschenswert, Effektoren zur Verfügung zu haben, die eine andere Wirkung als die bekannten Verbindungen aufweisen: So ist bekannt, daß Diabetes-mellitus-Patienten individuell "eingestellt" werden müssen, um eine optimale Behandlung ihrer Krankheit zu ermöglichen. So sollte bei einigen Fällen z.B. eine verringerte Aktivität von DP IV Effektoren ausreichen. Auch könnte eine zu hohe Inhibitor Aktivität und die permanen-

te Verabreichung desselben Medikaments insbesondere wegen der lebenslangen Dauer der Behandlung unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Weiter könnte es auch wünschenwert sein, gewisse Transporteigenschaften zur Erhöhung der Resorptionsgeschwindigkeit der Effektoren in vivo zu verbessern.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue (insbesondere aktivitätsmindernde) Effektoren zur Behandlung von z.B. beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern und ein einfaches Verfahren zur Behandlung dieser Krankheiten bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Dipeptidverbindungen bzw. Analoga von Dipeptiden, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze gelöst.

Bei der - vorzugsweise oralen - Verabreichung dieser Effektoren an einen Säugerorganismus werden die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₅ (o.a. GLP-1₇₋₃₇, oder deren Analoga) durch DP IV-oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert. Der Erfindung liegt also der Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

 die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukosestimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) führt, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-anloger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann;

- 2. die erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat;
- 3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in einer nachfolgenden Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

Insbesondere sind dazu erfindungsgemäß Dipeptidverbindungen geeignet, bei denen die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure, wie z.B. Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin oder Asparaginsäure, ausgewählt wird.

Die möglichst orale Applikation der erfindungsgemäßen hochaffinen, niedermolekularen Enzyminhibitoren ist eine kostengünstigere Alternative z.B. zu invasiven chirurgischen Techniken
bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und ClearanceEigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden.

Wie vorstehend erwähnt, kann es z.B. bei der Dauerbehandlung von Diabetes mellitus erforderlich sein, Effektoren mit einer definierten Aktivität zur Verfügung zu stellen, mit denen individuelle Bedürfnisse von Patienten erfüllt bzw. Symptome behandelt werden können. Die erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen weisen daher bei einer Konzentration (der Dipeptidverbindungen) von 10 µM, insbesondere bei den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen, eine Aktivitätsminderung von Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10, bevorzugt von mindestens 40 % auf. Häufig ist auch eine Aktivitätsminderung von mindestens 60 % bzw. mindestens 70 % erforderlich. Bevorzugte Effektoren können auch eine Aktivitätsminderung von maximal 20 % bzw. 30 % aufweisen. Weiterhin sind die Transporteigenschaften der vorliegenden Verbindungen, insbesondere durch den Peptidtransporter Pep T1 deutlich verbessert.

Besonders bevorzugte Dipeptidverbindungen sind L-alloIsoleucyl-Thiazolidid und seine Salze. Diese Verbindungen weisen im Verhältnis zu L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid bei in etwa gleichgroßer Wirkung bezüglich der Glukosemodulation überraschenderweise einen ca. fünffach besseren Transport durch den Peptidtransporter Pep Tl auf.

Weitere bevorzugte Verbindungen werden in Tabelle 1 angegeben.

Die Salze der erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen können z.B. organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sein. Besonders bevorzugt werden die Fumarate, die eine hervorragende Wirkung bei einer überraschend hohen Stabilität gegenüber Hydrolyse aufweisen und wesentlich weniger löslich sind als die Hydrochloride. Diese Eigenschaften sind auch bei der Galenik von Vorteil.

Ferner werden L-threo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, und L-allo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, bevorzugt.

Die Salze der Dipeptidverbindungen können in einem molaren Verhältnis von Dipeptid(analogon)komponente zu Salzkomponente von 1:1 oder 2:1 vorliegen. Ein derartiges Salz ist z.B. (Ile-Thia), Fumarsäure.

Besonders bevorzugte Salze sind die Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid und L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.

Die Erfindung betrifft somit Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) - bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität und deren Verwendung zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Effektoren der DP IVbzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen wie z.B. beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge mindestens eines erfindungsgemäßen Effektors der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, also Medikamente, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung oder deren Salze gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können z.B. als parenterale oder enterale Formulierungen vorliegen und entsprechende Träger enthalten bzw. sie können als orale Formulierungen vorliegen, die entsprechende zur oralen Verabreichung geeignete Träger enthalten können. Vorzugsweise liegen sie als orale Formulierungen vor.

Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen oder mehrere hypoglykämisch wirkende Wirkstoffe enthalten, die an sich bekannte Wirkstoffe sein können.

Die erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV bzw. der DP IVanalogen Enzymaktivität können zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus bzw. zur Herstellung eines entsprechenden Medikaments verwendet werden.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungen oder Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV-bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren

sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid und die in Tabelle 1 angegebenen Effektoren und deren Fumarsalze. Die erfindungsgemäßen Effektoren ermöglichen eine individuell einstellbare Behandlung von Patienten bzw. Krankheiten, wobei insbesondere individuell auftretende Unverträglichkeiten, Allergien und Nebenwirkungen vermieden werden können.

Auch weisen die Verbindungen unterschiedliche zeitliche Verläufe der Wirksamkeit auf. Dadurch wird dem behandelnden Arzt die Möglichkeit in die Hand gegeben, differenziert auf die individuelle Situation eines Patienten zu reagieren: Einerseits kann er die Geschwindigkeit des Eintritts der Wirkung und andererseits die Dauer der Wirkung und insbesondere die Stärke der Wirkung genau einstellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und
zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen,
die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, bei
Säugern und insbesondere in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten verabreicht, die den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien enthalten. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen pro Tag einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z.B. kann ein solcher Dosisbereich beim Menschen im Bereich von 0.01 mg bis 30.0 mg pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 0.01 bis 10 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Es wurde gefunden, daß durch Verabreichung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP,-42) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP- 1_{7-36}) (o.a. GLP- 1_{7-37} oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert werden. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des
behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie
beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie
sowie mögliche schwere metabolische Azidosen und Diabetes mellitus, Krankheitsbilder die Folge einer über einen längeren

Zeitraum erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

In der Reihe der aus dem Stand der Technik bekannten, oral wirksamen Antidiabetika ist bisher eine derartig wirksame, niedermolekulare Substanzklasse (mit Ausnahme des Biguanides Metformin: Molekulargewicht 130) nicht bekannt. Die Molekulargewichte der Aminoacyl Thiazolidide bewegen sich zwischen 146 (Glycyl Thiazolidid), 203 (Isoleucyl Thiazolidid) und 275 (Tryptophanoyl Thiazolidid). Im Vergleich bewegen sich die Molekulargewichte der Sulphonylharnstoffe (Glibenclamid: 494), der Saccharide (Acarbose: 630) sowie der Thiazolidindione (Pioglitazon: 586) im Bereich um 500 bis 700 Da. Physiologisch werden Aminoacyl Thiazolidide durch Aminopeptidasen sowie durch saure Hydrolyse in körpereigene Substanzen, wie Aminosäuren und Cysteamin, hydrolysiert, so daß die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als oral verfügbare Antidiabetika eine Bereicherung der Pharmazie darstellt.

Bei Ratten und Mäusen ist experimentell induzierte Hyperglykämie durch orale Verabreichung mit den erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen überdurchschnittlich gut behandelbar (Tabellen 2 und 3). Die Verabreichung des 500- bis 1000-fachen der wirksamen Dosis führte zu keiner nachweisbaren pathologischen Veränderung während drei-wöchiger toxikologischer Experimente an Ratten und Mäusen.

Die vorteilhafte Wirkung von erfindungsgemäßen Verbindungen auf DP IV ist in Tabelle 1 beispielhaft belegt:

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Effektoren auf die durch Dipeptidyl Peptidase IV katalysierte Hydrolyse von 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125.

Effektor	Effektoraffinität zu	% Restaktivität der DP IV in
	DP IV: Ki [nM]	Gegenwart von 10 µM Effektor
Metformin	» 1.000.000	100
Glibenclamid	» 1.000.000	100
Acarbose	» 1.000.000	100
H-Asn-Pyrrolidid	12.000	83,1
H-Asn-Thiazolidid	3.500	47,2
H-Asp-Pyrrolidid	14.000	81,6
H-Asp-Thiazolidid	2.900	45,6
H-Asp(NHOH)-Pyrrolidid	13.000	88,2
H-Asp(NHOH)-Thiazolidid	8.800	54,5
H-Glu-Pyrrolidid	2.200	38,5
H-Glu-Thiazolidid	610	25,0
H-Glu(NHOH)-Pyrrolidid	2.800	44,9
H-Glu(NHOH)-Thiazolidid	1.700	36,5
H-His-Pyrrolidid	3.500	49,7
H-His-Thiazolidid	1.800	35,2
H-Pro-Pvrrolidid	4.100	50,2
H-Pro-Thiazolidid	1.200	27,2
H-Ile-Azididid	3.100	43,8
H-Ile-Pyrrolidid	210	12,3
H-L-allo-Ile-Thiazolidid	190	10,0
H-Val-Pyrrolidid	480	23,3
H-Val-Thiazolidid	270	13,6

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Pyrrolidide und Aminoacyl Thiazolidide durch die in den Mucosazellen des Dünndarms, im Serum und in Leberzellen vorhandenen Enzyme Prolin Aminopeptidase und Prolidase abgebaut werden können und der Thiazolidinring zur Öffnung in Gegenwart von Säuren (beispielsweise im Magen) unter Bildung des adäquaten Cysteamin-Derivates neigt [vgl. US 458407]. Es war daher überraschend, eine dosisabhängige Wirksamkeit der Wirkstoffe nach per oraler Verabreichung zu finden. Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von L-allo-Ile-Thiazolidid auf die Serum-DP IV Aktivität nach oraler Applikation von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid an gesunden Wistarratten ist mit folgender Tabelle belegt:

Tabelle 2: Restaktivität der DP IV im Serum gegenüber 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125, nach oraler Gabe und in Abhängigkeit von der Dosis L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, bestimmt 30 min nach Applikation des Inhibitors.

Dosis pro Versuchstier	Restaktivität der DP IV in %		
0 mg	100		
2,5 mg	52		
5,0 mg	40		
10 mg	28		
20 mg	29		

Ausgesprochen überraschend und wünschenswert ist die im diabetischen Tiermodell erzielte Glukose-reduzierende Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs L-allo-Isoleucyl Thiazolidid nach

seiner oralen Verabreichung bei zeitgleicher oraler Glukose-Stimulierung (Tabelle 3).

Zur Verstärkung der blutzuckersenkenden Wirkung verschiedener Antidiabetika werden häufig Kombinationen verschiedener oral wirksamer Antidiabetika eingesetzt. Da sich die antihypergly-kämische Wirkung der efindungsgemäßen Effektoren unabhängig von anderen bekannten oral applizierbaren Antidiabetika entfaltet, eignen sich die erfindungsgemäßen Wirkstoffe analog in entsprechender galenischer Form, zur Erzielung des gewünschten normoglykämischen Effektes, zum Einsatz bei Kombinationstherapien.

Somit können die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen in an sich bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie z. B. Tabletten, Kapseln, Dragees, Pillen, Suppositorien, Granulate, Aerosole, Sirupe, flüssige, feste und cremeartige Emulsionen und Suspensionen und Lösungen unter Verwendung inerter, untoxischer, pharmazeutisch geeigneter Träger- und Zusatzstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei liegen die therapeutisch wirksamen Verbindungen jeweils vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0.1 bis 80, vorzugsweise von 1 bis 50 Masseprozent der Gesamtmischung vor, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Tabelle 3: Reduktion der zirkulierenden Blutglukose innerhalb 60 min nach oraler Verabreichung von 20 µM L-allo-Ile-Thiazolidid an Ratten verschiedener Tiermodelle bei zeitgleichem Glukosetoleranztest (Angaben in % bezogen auf normoglykämische Werte).

Tiermodell	Glukosekonzentration in % Kontrolle	Glukosekonzentration in % L- allo-Ile-Thiazolidid behandelt	
Wistarratte, normal	100	82	
Wistarratte (Diabetes 2b - Model, dick)	100	73	

Die gute Resorption der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen durch Schleimhäute des gastrointestinalen Traktes ermöglicht die Anwendung von vielen galenischen Zubereitungen:

Die Substanzen können als Medikament in Form von Dragees, Kapseln, Beißkapseln, Tabletten, Tropfen, Sirup, aber auch als Zäpfchen oder als Nasensprays angewendet werden.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken des Wirkstoffs mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgatoren und/oder Dispergiermitteln, wobei z.B. im Fall des Einsatzes von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Als Hilfsstoffe seien beispielhaft aufgeführt: Wasser, untoxische organische Lösungsmittel, wie Paraffine (z. B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z. B. Rapsöl, Erdnußöl, Sesamöl), Alkohole (z.B. Ethylalkohol, Glycerin), Glykole (z.B. Propylenglykol, Polyetylenglykol); feste Trägerstoffe, wie z. B. natürliche Gesteinsmehle (z. B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z.B. Roh-, Milch- und Traubenzucker); Emulgiermittel, wie nichtionogene und anionische Emulgatoren (z.

B. Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, Alkylsulfonate und Arylsulfonate), Dispergiermittel (z.B. Lignin, Sulfitablaugen, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumlaurylsulfat) und gegebenenfalls Aromastoffe.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise enteral oder parenteral, insbesondere oral. Im Falle der enteralen Anwendung können Tabletten außer den genannten Trägerstoffen weitere Zusätze wie Natriumcitrat, Calciumcarbonat und Calciumphosphat, zusammen mit verschiedenen Zuschlagsstoffen, wie Stärke, vorzugsweise Kartoffelstärke, Gelatine und dergleichen enthalten. Weiterhin können Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum zum Tablettieren mitverwendet werden. Im Falle wäßriger Suspensionen und/oder Elixieren, die für orale Anwendungen gedacht sind, können die Wirkstoffe außer mit den oben genannten Hilfsstoffen zusätzlich mit verschiedenen Geschmacksaufbesserern oder Farbstoffen versetzt werden.

Bei einer parenteralen Anwendung können Lösungen der Wirkstoffe unter Verwendung geeigneter flüssiger Trägermaterialien eingesetzt werden. Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei intravenöser Applikation Mengen von etwa 0,01 bis 2,0 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht pro Tag zur Erreichung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen, und bei enteraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 2 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Versuchstieres oder Patienten bzw. der Art des Applikationsweges, aber auch aufgrund der Tierart und deren individuellem Verhalten gegenüber dem Medikament bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Fall der Applikation größer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehrere Einzelgaben über den Tag zu verteilen. Für die Applikation in der Humanmedizin ist der gleiche Dosierungsspielraum vorgesehen. Sinngemäß gelten hierbei auch die obigen Ausführungen.

Beispiele für pharmazeutische Formulierungen

1. Kapseln mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid pro Kapsel:

Für ca. 10 000 Kapseln wird eine Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid	1,0	kg
Glycerin	0,5	·kg
Polyethylenglykol	3,0	kg
Wasser	0.5	kg
	5.0	kα

Die Lösung wird nach an sich bekannter Weise in Weichgelatinekapseln abgefüllt. Die Kapseln sind zum Zerbeißen oder zum Schlucken geeignet.

2. Tabletten bzw. lackierte Tabletten oder Dragees mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid:

Die folgenden Mengen beziehen sich auf Herstellung von 100 000 Tabletten:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid,

fein vermahlen	10,0	kg
Glukose	4,35	kg
Milchzucker	4,35	kg
Stärke	4,50	kg
Zellulose, fein vermahlen	4,50	kg

Obige Bestandteile werden gemischt und anschließend mit einer Lösung, hergestellt aus

Polyvinylpyrrolidon		2,0	kg
Polysorbat		0,1	kg
und Wasser	ca.	5,0	kg

versehen und in an sich bekannter Weise granuliert, indem die feuchte Masse geraspelt und nach Zugabe von 0,2 kg Magnesiumstearat getrocknet wird. Die fertige Tablettenmischung von 30,0 kg wird zu gewölbten Tabletten von 300 mg Gewicht verarbeitet. Die Tabletten können nach an sich bekannter Weise lackiert oder dragiert werden.

19

Die technischen Daten bevorzugter Verbindungen werden nachstehend angegeben.

Untersuchungen zu Ile-Thia*Fumarat (Isomere) und anderen Salzen

Substanz	K,	Fp (°C)	CE (min)	MS	[a]H ₂ O
L-threo-IT*F	8*10 ⁻⁸	150 ^{0SC}	160	203	-10,7 (405nm)
D-threo- IT*F	keine Hemmung	147	158	203	nicht bestimmt
L-allo-IT*F	2*10 ⁻⁷	145-6	154	203	-4,58 (380nm)
D-allo-IT*F	keine Hemmung	144-6	150	203	4,5 (380nm)

IT*F = Isoleucyl-Thiazolidid Fumarat

Die NMR und HPLC Daten bestätigen, daß es sich um die entsprechenden Substanzen handelte

Meßbedingungen für die K.-Bestimmung der Substanzen

Enzym:

DPIV_{Schweineniere}, 0,75mg/ml, 18U/ml (GPpNA)

in 25mM Tris pH 7,6, 30% Ammonium sulfat, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTE

Stammlösung: 1:250 verdünnt in Meßpuffer

Puffer:

40mM HEPES pH 7,6, I=0,125 (KCl)

Substrat:

GPpNA*HCI

Stammlösung: 2,1mM

Meßgerät:

Perkin-Elmer Bio Assay Reader, HTS 7000 Plus,

T=30°C λ= 405nm

Meßansatz:

100µl Puffer

100μl Substrat (3 verschiedene Konzentrationen 0,8mM – 0,2mM)

50μl Wasser/Inhibitor (7 verschiedene Konzentrationen 2,1μM – 32,8nM)

10µl Enzym

Puffer, Wasser/Inhibitor und Enzym wurden auf 30°C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe von ebenfalls vortemperiertem Substrat gestartet. Es wurden 4fach Bestimmungen durchgeführt. Die Meßzeit betrug 10min.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztischmikroskop der Leica-Aktiengesellschaft, die Werte sind nicht korrigiert, oder an einem DSC-Gerät (bei Heumann-Pharma) bestimmt.

Optische Rotation

Die Drehwerte wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem "Polarimeter 341" oder höher der Fa. Perkin Elmer aufgenommen.

Meßbedingungen für die Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem "API 165" bzw. "API 365" der Fa. PE Sciex mittels Elektrosprayionisation (ESI) aufgenommen.

Es wird mit einer ungefähren Konzentration von $c = 10 \mu g/ml$ gearbeitet, die Substanz wird in MeOH / H_2O 50:50, 0,1 % HCO_2H aufgenommen, die Infusion erfolgt mit Spritzenpumpe (20 μ l/min).Die Messungen erfolgten im Positivmodus [M+H]⁺, die ESI-Spannung beträgt U = 5600V.

Die Salze weisen die folgenden Daten auf:

IT*Salz	K,	M (gmol ⁻¹)	Fp (°C)
Succinat	5,1 e-8	522,73	116
Tartrat	8,3 e-8	352,41	122
Fumarat	8,3 e-8	520,71	156
Hydrochlorid	7,2 e-8	238,77	169
Phosphat	1,3 e-7	300,32	105

Löslichkeitsuntersuchung der Salze des Ile-Thia

Ile-Thia*Fum

Einwaage 10,55 mg entspricht 0,02 mmol (520,72 g/mol) Zugabe von 100 µl H₂O_{dest} 100 µl keine Lösung, optisch: keine Oberflächenbenetzung 21

ab 200 µl sukzessiver Beginn der Löslichkeit bei 400µl ist eine vollständiges Lösen zu beobachten 2,63 % Bei diesem Salz wurde also festgestellt, daß es kaum benetzbar ist und sich nicht zersetzt.

Ile-Thia*Succ

Einwaage 16,6 mg entspricht 0,031 mmol (522,73 g/mol) Zugabe von 16 μ l H_2O_{dest} 16 μ l keine Lösung, optisch "Aufsaugen" der Feuchtigkeit von 66 μ l – 1,5 ml kein vollständiges Lösen der Substanz zu beobachten

Ile-Thia*Tartrat

Einwaage 17,3 mg entspricht 0,049 mmol (352,41 g/mol) Zugabe von 100 μ l H_2O_{dest} 100 μ l vollständiges Lösen 17,3 %

Lie-Thia*Phos

Einwaage 15,5 mg entspricht 0,051 mmol (300,32 g/mol) Zugabe von 100 μl H₂O_{dest} 100 μl Anlösen ist zu beobachten sukzessive Zugabe von 100 μl H₂O bei 400 μl vollständiges Lösen 3,87 %

Ile-Thia*HCl

Einwaage 16,1 mg entspricht 0,067 mmol (238,77 g/mol) Zugabe von 100 μl H₂O_{dest} bei 100 μl vollständiges Lösen 16,1 %

Allgemeine Synthese Ile-Thia*Salz

Die Boc-geschüzte Aminosäure Boc-Ile-OH wird in Essigsäureethylester vorgelegt, der Ansatz wird auf ca. -5 °C gekühlt. N-Methylmorpholin wird zugetropft, Pivalinsäurechlorid (Labor) bzw. Neohexanoylchlorid (Technikum) wird unter Temperaturkonstanz zugetropft. Die Reaktion wird für wenige Minuten zur Aktivierung gerührt. N-Methylmorpholin (Labor) und Thiazolidinhydrochlorid (Labor) werde nacheinander zugetropft, Thiazolidin (Technikum) wird zugegeben. Die Aufarbeitung im Labor erfolgt klassisch mit Salzlösungen, im Technikum wird der Ansatz mit NaOH- und CH₃COOH-Lösungen gereinigt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird durch HCl / Dioxan (Labor) bzw. H₂SO₄ (Technikum) erzielt.

Im Labor wird das Hydrochlorid aus EtOH / Ether kristallisiert.

Im Technikum wird das freie Amin durch Zugabe von NaOH / NH₃ dargestellt. Furnarsäure wird in heißen Ethanol gelöst, das freie Amin wird zugetropft, es fällt (Ile-Thia)₂-Furnarat (M = 520,71 gmol⁻¹).

Die Analytik von Isomeren bzw. Enantiomeren erfolgt durch Elektrophorese.

Patentansprüche

- Dipeptidverbindung, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet wird, und deren Salze.
- Dipeptidverbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure ausgewählt wird.
- 3. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei einer Konzentration von 10 μ M eine Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10 % bewirkt.
- 4. Dipeptidverbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aktivitätsminderung von mindestens 40 % bewirkt.
- 5. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin und Asparaginsäure ausgewählt wird.
- 6. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich L-threo-Isoleucyl Pyrrolidid, L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, 1-allo-Isoleucyl Pyrrolidid und deren Salze.
- 7. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Salze organische Salze wie

WO 99/61431

Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sind.

- 8. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einem molaren Verhältnis von Dipeptidverbindung zu Salz von 1:1 oder 2:1 vorliegen.
- 9. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich Fumarsalze.
- 10. Salze von Dipeptidverbindungen nach Anspruch 9, nämlich Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid oder Fumarsalze von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.
- 11. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung oder deren Salze nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthält.
- 12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Träger für parenterale oder enterale Formulierungen handelt.
- 13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Formulierung zur oralen Verabreichung vorliegt.
- 14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen hypoglykämisch wirkenden Wirkstoff enthält.

- 15. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV analogen Enzymaktivitäten.
- 16. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung
 eines Medikaments zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter
 die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säugers.
- 17. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung
 eines Medikaments zur oralen Behandlung von mit Diabetes
 mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen.
- 18. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Kapillarzonenelektrophorese (CE) -Trennung der Isomere des Isoleucyl Thiazolidids

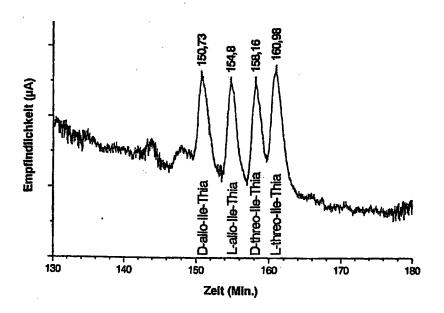


Abb. 1: CE-Trennung von einer 1:1:1:1 – Mischung von L-threo-Ile-Thia*Fum, L-allo-Ile-Thia*Fum, D-threo-Ile-Thia*Fum, D-allo-Ile-Thia*Fum

Methode und Meßbedingungen:

CE-Untersuchungen erfolgten am "P/ACE™ System MDQ" der Firma Beckman:

Substanz	<u>CE</u> (min)
L-threo-IT*F	160
D-threo-IT*F	158
L-allo-IT*F	154
D-allo-IT*F	150

Laufbedingungen:

Puffer: 20 mM Phosphat, pH 7,0, 100 mM β-Hydroxy-propyl-cyclodextrin

Kapillare: 50 / 60,2 cm, 25 µm Innendurchmesser, beschichtet mit Acrylamid

Spannung: 10 kV

Detektion: Photo-Dioden-Array-Detektor bei 214 nm

Temperatur: 7°C

CE-Trennung von Ile-Thia*Fumarat

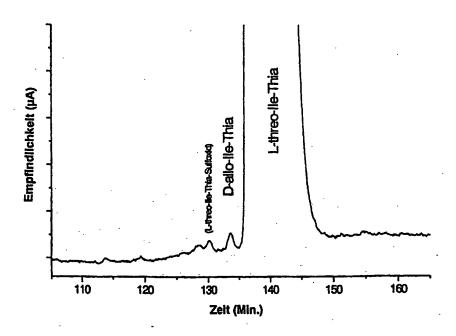


Abb. 2: CE-Trennung von einer 1:1000 Mischung L-threo-Ile-Thia*Fumarat zu D-allo-Ile-Thia*Fumarat

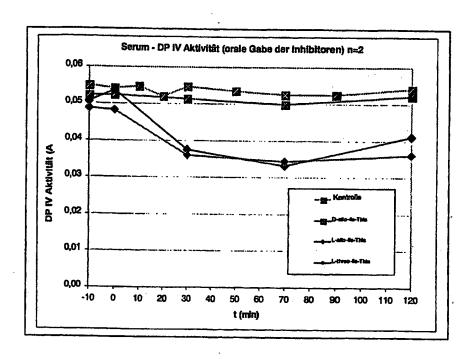
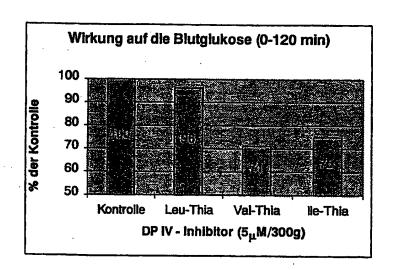


Abb. 3: Serum DP IV-Aktivität nach oraler Applikation verschiedener H-Ile-Thia Stereoisomere (5 μ M/300 g Ratte). Beeinflussung der Enzymaktivität erflolgt nur durch L-allo-Ile-Thia und L-threo-Ile-Thia.

Abb. 4: Wirkung verschiedener Aminoacyl-Thiazolidide auf die Glukosetoleranz der Ratte (Oraler Glukosetoleranztest mit 2g/300g Wistarratte zum Zeitpunkt 0, Gabe der DP IV-Inhibitoren 10 min vor oraler Glukosestimulierung)



Internacional Application No PCT/EP 99/03712

A CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07D277/04 A61K31/425 C07D295/	18 CO7D417/12	
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classific	ation and IPC	
B. FIELDS	SEARCHED		·
Minimum do IPC 6	cumentation searched (classification system tollowed by classificati CO7D A61K	on symbols)	
Documental	ion esarched other than minimum documentation to the extent that a	such documents are included in the fields se	erched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data ba	so and, where practical, search terms used	
C. DOCUM	ENT'S CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the re-	evant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTITE NATURSTOFF-FORSCHUNG) 6 November 1997 (1997-11-06) cited in the application claims; examples 2,3	JT FÜR	1-18
X	WO 95 15309 A (FERRING BV) 8 June 1995 (1995-06-08) claims		1–18
		-/	
			·
	L		
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
	tegories of cited documents : ent defining the general state of the last which is not	"T" tater document published after the inte or priority date and not in conflict with	the application but
"E" earlier	lered to be of particular relevance document but published on or after the international	cited to understand the principle or th invention "X" document of particular relevance; the or	
which	erre ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another n or other epecial reason (as apecified)	cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the o	be considered to current is taken sione salmed invention
O docum other	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or meens an published prior to the international filing date but	cannot be considered to involve an in document is combined with one or me ments, such combination being obvior in the art.	ore other such docu-
later t	nan the priority date dalmed	"&" document member of the same patent	
	September 1999	Date of mailing of the international second	агин героп
Name and	nailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016	Henry, J	

1

PCT/EP 99/03712

C (C	Alex Market Mark	PCT/EP 99/03712	
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Catagory Citation of document, with indication where appropriate of the relevant accessory.			
PRIBACIA	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14 October 1991 (1991–10–14) Columbus, Ohio, US;	1-18	
	abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and		
	proliferation of human lymphocytes" page 37; XP002114197 abstract		
	& BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, vol. 372, no. 5, 1991, pages 305-311,		
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB;	1-18	
	Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV HALLE)		
	21 November 1991 (1991-11-21) cited in the application abstract		
	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13 January 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" page 241; XP002114198	1-18	
	abstract & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., no. 14, 1995, pages 709-710,		
	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21 June 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, page 933; XP002114199 abstract	1-18	
	& JP 04 334357 A (FUJEREBIO INC) 20 November 1992 (1992-11-20)		
	-/		

Internacional Application No
PCT/EP 99/03712

		PCT/EP 9	9/03/12
	RITION) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
ategory *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
X	HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure—activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 41, no. 9, 1993, pages 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009-2363 the whole document		1-8
	. 		
		•	
	-	·	
		•	
	·		
		•	

1

ormation on patent family members

Internacional Application No PCT/EP 99/03712

Patent document cited in search repor	nt	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740832	Α.	06-11-1997	DE 19616486 A	30-10-1997
			AU 3023397 A	19-11-1997
			CN 1216468 A	12-05-1999
			EP 0896538 A	17-02-1999
WO 9515309	Α	08-06-1995	AU 1113395 A	19-06-1995
			AU 8421998 A	12-11-1998
			CA 2178066 A	08-06-1995
			CN 1141033 A	22-01-1997
			CZ 9601595 A	15-01-1997
			EP 0731789 A	18-09-1996
			FI 962315 A	05-08-1996
			HU 76274 A	28-07-1997
			JP 9509921 T	07-10-1997
			NO 962269 A	30-07-1996
			PL 314838 A	30-09-1996
~			ZA 9409525 A	02-08-1995
DD 296075	Α	21-11-1991	NONE	
JP 4334357	Α	20-11-1992	NONE	·

PCT/FP 99/03712

		PC1/EF 99/	N2\ 15				
A. KLASSII IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES CO7D277/04 A61K31/425 CO7D295/	18 C07D417/12					
•							
			•				
	ternationalen Patentklaasifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	sitikation und der IPK					
	RCHIERTE GEBIETE ner Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol	la)					
IPK 6	CO7D A61K						
Recherchier	rts aber nicht zum Mindestprütstoft gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen				
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elsktronische Datenbank (No	erne der Datenbenk und evtl. verwendete S	luchbegriffe)				
- 			-				
	VOCADO DEL ALIMANETE						
	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Rezelchnung der Veröffentlichung sowell erforterlich unter Angebe	rior in Catenate leaves-and- Tab.	Role Assessed M				
Kategorie*	Bazelchnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	o der in deutscht Kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.				
Х	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTITU	T FÜR	1-18				
^	NATURSTOFF-FORSCHUNG)	, i un	1 10				
	6. November 1997 (1997-11-06)						
	in der Anmeldung erwähnt						
[Ansprüche; Beispiele 2,3	,	•				
X	WO 95 15309 A (FERRING BV)		1-18				
	8. Juni 1995 (1995-06-08)						
	Ansprüche	·					
	-	./					
			•				
ļ							
			,				
		•					
			·				
N	Vern Vernification resum and dea Extended	Place Ashers Park Comme	· ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,				
entn	itere Veröffentlichungen eind der Fortsetzung von Feld C zu nehmen	X Sighe Anhang Patentfamilie	·.				
"A" Veröffe	ertlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert.	T Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht	worden ist und mit der				
aber n	smittning, die den angemenen Stand der Lechnet deinnert, nicht ab besonders bedeutaam anzusehen ist Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen	Anmeldung nicht kollidiert, sondern nut Erfindung zugrundeliegenden Prinzips	r zum Veretändnis des der				
Anmeidedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung							
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prtoritätsanspruch zweitelhaft er- scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer endsren im Recherchenbertcht genannten Veröffentlichung being werden soll oder die aus einem anderen besonderen Gnund anneceten ist fivia							
		IGEN I TROTT AND AUT OF TRICE I AUGR	sea perunena petracmet				
"O" Veröffe	ausgeführt) **O' Veröftentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Bezutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht						
"P" Veröfie	entlichung, die vor dem internationalen Anmaldedatum aber nach	diese Verbindung für einen Fachmann *& Veröffentlichung, die Mitglied derselben					
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Ra					
	Contact of Food						
L3	3. September 1999	17/09/1999					
Name und	Postanachrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter					
İ	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk						
1	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fex: (+31-70) 340-3016	Henry, J					

1

Internacionales Aktenzeichen PCT/EP 99/03712

		99/03712
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Telle	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14. Oktober 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" Seite 37; XP002114197 Zusammenfassung & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, Bd. 372, Nr. 5, 1991, Seiten 305-311,	1-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21. November 1991 (1991-11-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13. Januar 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" Seite 241; XP002114198 Zusammenfassung & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., Nr. 14, 1995, Seiten 709-710,	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21. Juni 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, Seite 933; XP002114199 Zusammenfassung & JP 04 334357 A (FUJEREBIO INC) 20. November 1992 (1992-11-20)	1-18

Internauonales Aktenzeichan
PCT/EP 99/03712

(Fortset	rung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	PCI/EP 99/03/12	
tegorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommend	len Teite Betr. Anspruch Nr.	
	HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure—activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 41, Nr. 9, 1993, Seiten 1583—1588, XPO02114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009—2363 das ganze Dokument	1-8	
	das ganze bokument		
	·	• •	
,			
•			•
			•

Angaben zu Veröffentlichun die zur selben Patentlamitie gehören

Internacionales Aktenzeichen PCT/EP 99/03712

	cherchenberich es Patentdokur		Datum der Veröffentlichung		litglied(er) der Patentiamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9	9740832	Α	06-11-1997	DE	19616486 A	30-10-1997
				AU	3023397 A	19-11-1997
				CN	1216468 A	12-05-1999
				EP	0896538 A	17-02-1999
WO 9	9515309	A	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
				AU	8421998 A	12-11-1998
			•	CA	2178066 A	08-06-1995
				CN	1141033 A	22-01-1997
				CZ	9601595 A	15-01-1997
				EP	0731789 A	18-09-1996
				FI	962315 A	05-08-1996
				HU	76274 A	28-07-1997
				JP	9509921 T	07-10-1997
				NO	962269 A	30-07-1996
				PL	31 483 8 A	30-09-1996
				ZA	9409525 A	02-08-1995
DD 2	296075	Α .	21-11-1991	KEINE		
JP 4	1334357	A	20-11-1992	KEINE		